

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16570

研究課題名（和文）レボドパ誘発ジスキネジアの発症機序の解明と新規薬物治療の開発

研究課題名（英文）Pathophysiology and treatment for levodopa-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease

研究代表者

西島 春生（Nishijima, Haruo）

弘前大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90858177

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：片側パーキンソン病モデルラットを作成しレボドパを反復投与してジスキネジアを発現させたところ、ドパミン脱神経側の淡蒼球内節が対側に比して拡大していた。この部位を電子顕微鏡で観察して直接路の神経終末がGABAを多量に含んで著明に肥大していることを見出した。この神経終末肥大がレボドパ反復投与に伴って徐々に進行していくことも確認した。同様のモデルを用いてカベルゴリンやアマンタジンの効果を検証しそれぞれ論文発表した。また高齢モデルではジスキネジアが軽症でジスキネジアに伴う淡蒼球内節の拡大やダイノルフィン発現が抑制されることを見出し論文発表した。レボドパ誘発ジスキネジアの病態機序についての総説を執筆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

社会の高齢化に伴いパーキンソン病はパーキンソン・パンデミックと呼ばれるほど患者数が増加してきている。レボドパはパーキンソン病に最も有効な治療薬であるが、ウェアリング・オフやレボドパ誘発ジスキネジアといった運動合併症が治療上の最大の問題点である。根治療法が未開発の現在、レボドパ治療を最適化することがパーキンソン病治療において最も重要である。本研究の成果はレボドパ誘発ジスキネジアの病態機序の全容解明に寄与するものであった。さらにジスキネジアの治療法のいくつかを動物モデルにおいて検討した。今後ジスキネジアの病態機序に基づいた治療を実用化することができれば、パーキンソン病治療を進歩させることができる。

研究成果の概要（英文）：I created unilateral Parkinson's disease model rats and treated them with levodopa. Levodopa treatment induced dyskinesia-like abnormal involuntary movements in model rats. Globus pallidus internus was enlarged in the dyskinesia model. Using an electron microscopy, I found that nerve terminals of the direct pathway striatal projection neurons in the globus pallidus internus showed remarkable hypertrophy including massive GABA and that this hypertrophy gradually progressed along with repeated levodopa treatment. The effects of cabergoline and amantadine on dyskinesia were investigated in the same dyskinesia models and I have published two papers. In addition, I found that dyskinesia was mild in an aged model and that enlargement of globus pallidus internus and overexpression of dynorphin in the striatum with dyskinesia were suppressed with aging. I published a paper on these finding. I also wrote a review paper on the pathogenesis of levodopa-induced dyskinesia.

研究分野：医歯薬学

キーワード：レボドパ誘発ジスキネジア パーキンソン病 シナプス可塑性 樹状突起上スパイン 淡蒼球内節 直接路 アマンタジン カベルゴリン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病はアルツハイマー病に次いで2番目に多い神経変性疾患である。振戦、固縮、寡動といった運動症状を呈し病理学的には黒質緻密部のドーパミン神経が進行性に脱落する。65歳以上では人口の1%程度にみられ、高齢化に伴い「パーキンソン・パンデミック」と呼ばれるほど患者数が増加してきている。パーキンソン病治療の中心となるのは、ドーパミンの前駆体であるレボドパによるドーパミン補充療法である。レボドパは種々のパーキンソン病治療薬のうち運動症状に対する効果が最も高い薬剤であるが、長期使用によりウェアリング・オフやジスキネジア(体をくねらせるような異常な不随意運動)という運動合併症を高率に起こし、このことがパーキンソン病薬物治療の最大の問題点となっている。レボドパ以外のパーキンソン病治療薬のほとんどはレボドパ治療に伴うウェアリング・オフやジスキネジアに対応するために開発されてきたと言っても過言ではない。

レボドパ誘発ジスキネジアはパーキンソン病患者に対する反復間欠的レボドパ投与により起こり、日本ではパーキンソン病発症後15年で63%の患者で発症すると報告されている(Sato et al., *Mov Disord* 2006; 21: 384-395)。いったん発症するとレボドパ投与ごとに容易に症状が出現し、治療が難しい。現在臨床応用されているレボドパ誘発ジスキネジアの治療薬はアマタジン1種のみで、その効果は限定的である。パーキンソン病モデル動物を用いた基礎研究や小規模な臨床研究では、他の薬剤のレボドパ誘発ジスキネジアに対する有効性も示されているが、今のところ臨床応用に至った薬剤はない。

レボドパ誘発ジスキネジアの発症機序についてはこれまでの基礎研究により、線条体の出力神経細胞(spiny projection neurons, SPNs)を中心とする神経回路のシナプス伝達の可塑的異常が重要な役割を果たしていることが分かっている。特に直接路SPNが興奮性入力に対して過感受性を持つようになることが重要な機序の一つと考えられている。我々は以前の研究でドレブリン免疫染色及び細胞内蛍光色素注入により直接路SPNの樹状突起上スパインの頭部が肥大していることを証明している(Nishijima et al., *Neuropathology* 2013; 33: 391-396 及び Nishijima et al., *Mov Disord* 2014; 29: 336-343)。この知見は直接路SPN入力部における過感受性獲得の基盤となる形態学的変化を示したものである。しかし直接路SPNの出力部における変化を含め、過感受性獲得に至る機序については未解明の部分も多く残されている。

パーキンソン病の根治療法が開発されていない現状において、よりよいパーキンソン病治療のためにはレボドパ治療の最適化が必要であり、そのためにはレボドパ誘発ジスキネジアの病態機序の全容解明と治療薬の開発が重要である。

2. 研究の目的

今回の研究の目的は、レボドパ誘発ジスキネジア発症の機序を解明すること、そしてレボドパ誘発ジスキネジアに対して有効な治療法を探索することであった。

3. 研究の方法

雄のウィスターラットを用いた。10週齢時にステレオ手術で6-hydroxydopamineを片側の内側前脳束に注入、2週間後にアポモルフィン投与テストを行い行動評価所見から片側ドーパミン脱神経の達成を確認、合格したラットを片側パーキンソン病モデルラットとした。アポモルフィンテストから1~2か月経過してから、ラットを各群に分けてレボドパ、抗ジスキネジア薬、またはプラセボ(生理食塩水)の反復投与を行った。抗ジスキネジア薬として、NMDA受容体拮抗薬であり抗ジスキネジア薬として現在唯一臨床で実用化されているアマタジン、AMPA受容体拮抗薬のペランパネル、長期作用型ドーパミンアゴニストのカベルゴリン、セロトニン1A受容体アゴニストの8-Hydroxy-DPAT hydrobromideを用いた。片側パーキンソン病モデルラットにレボドパを投与すると、半身の寡動症状が改善するとともにパーキンソン病患者で発現するレボドパ誘発ジスキネジアに相当するような異常な不随意運動が出現する。不随意運動発現の程度をAbnormal Involuntary Movement score (AIMスコア)(Cenci and Lundblad, *Curr Protoc Neurosci* 2007; Unit 9 25)で評価し、AIMスコアの上昇を示したラットをレボドパ誘発ジスキネジアモデルラットとした。AIMスコアの推移を評価することで、ジスキネジアの程度、薬物のジスキネジア抑制効果を検討した。さらに薬剤最終投与翌日に脳を摘出して切片を作成、免疫組織生化学的評価を行った。免疫染色はドーパミン脱神経を証明するためにチロシンヒドロキシラーゼに対する抗体、樹状突起上スパインの評価のためにスパインに局在するアクチン結合蛋白であるドレブリンに対する抗体を用いて行った。ドレブリン陽性構造物の大きさを評価することで、間接的にだが樹状突起上スパインの変化を推測した。また、直接路SPNは淡蒼球内節に投射しているので、淡蒼球内節を電子顕微鏡で観察して神経終末の形態を評価した。

加齢による影響を調べる実験では、6-hydroxydopamine注入手術の時期を88週齢時に、薬物治療時期を93週齢時に行い、前記の若年成体での結果と比較した。

4. 研究成果

(1) 片側パーキンソン病モデルラットに50 mg/kgの高用量レボドパを14日間1日2回腹腔

内投与してジスキネジアを発現させた。このモデルの病変側淡蒼球内節を観察したところ、その容積が増大していた。さらに拡大している淡蒼球内節を電子顕微鏡で観察し、直接路の神経終末が GABA を多量に含んで著明に肥大していることを発見した。さらに淡蒼球内節ではジスキネジア発現時に GABA 濃度が上昇することを確認した。レボドパ誘発ジスキネジアのプライミングと発現の仕組みとして、レボドパ反復投与により直接路神経細胞の神経終末に GABA が蓄積されそれがレボドパ投与ごとにシナプス間隙に多量に放出されることでジスキネジアが発現するという機序が推測された。

(2) 片側パーキンソン病モデルラットに 6 mg/kg の治療用量のレボドパを様々な期間、1日2回腹腔内投与した(0、3、7、14日)。淡蒼球内節を電子顕微鏡で観察し、神経終末肥大がレボドパの反復投与に伴って徐々に進行していく過程を確認した。この肥大はセロトニン 1A 受容体アゴニストである 8-Hydroxy-DPAT hydrobromide の併用により抑制された。これらの成果についてまとめた論文を投稿中である。

(3) 片側パーキンソン病モデルラットに 6 mg/kg のレボドパを1日2回、14日間経口投与した。レボドパ長期作用型ドパミンアゴニストのカベルゴリンを併用すると、ジスキネジアの発現が抑制された。ジスキネジアに伴ってみられる淡蒼球内節の拡大や、線条体ダイノルフィン発現も、カベルゴリン投与により抑制された。ドパミン受容体を持続的に刺激する長期作用型ドパミンアゴニストがジスキネジア抑制効果を持つことが証明された。このことは、臨床において早期からオフをつくらないように薬剤調整することでジスキネジア発現を予防できるのではないかという仮説を裏付けるものであった。これらの研究成果をまとめ、論文発表した。

(4) 片側パーキンソン病モデルラットに 6 mg/kg のレボドパまたはプラセボ(生理食塩水)を1日1回腹腔内投与した。以下の4群でジスキネジアの程度を比較した; レボドパを31日間、レボドパ+アマンタジン(AMT)を31日間、レボドパを15日間の後レボドパ+AMTを16日間、レボドパ+AMTを15日間の後レボドパを16日間。1、7、14、16、22、29日目にAIMスコアを測定した。AMTのジスキネジア抑制効果は、最初からレボドパと併用した時も、途中から併用した時も、開始1日目には明らかであったが、7日目以降には失われてしまった。一方、レボドパの効果持続時間延長(オフ時間短縮)の効果は反復投与後に出現した。臨床でのAMT使用に際しては、これらの効果変動に留意する必要があることが分かった。これらの研究成果をまとめ、論文を執筆、投稿し、受理された。

(5) 片側パーキンソン病モデルラットに 6 mg/kg のレボドパを14日間腹腔内投与し、ペランパネルを併用することによるジスキネジア抑制効果を少数例で検討した。ペランパネルを併用すると14日目の評価においてレボドパ投与後の時間経過中にジスキネジアの発現がわずかに抑制された。ペランパネルとAMTの2剤をレボドパに併用した場合、1日目のジスキネジア抑制は顕著であったが、14日目には抗ジスキネジア効果はほとんど消失してしまった。ペランパネル投与群でレボドパ投与後の自傷行為が顕著となることがたびたびみられたため、統計学的検討ができるほどに数を増やすことは断念した。

(6) 若年成体及び高齢モデルラットでジスキネジア発現、ジスキネジアに伴ってみられる淡蒼球内節の拡大の程度、線条体ダイノルフィン発現の程度を評価した。若年発症(10週齢時手術)+プラセボ治療、若年発症+若年治療(15週齢時)、若年発症+高齢治療(93週齢時)、高齢発症(88週齢時手術)+プラセボ治療、高齢発症+高齢治療、の5群で比較した。高齢発症群で若年発症群よりもジスキネジア発現が軽度であった。淡蒼球内節の拡大は高齢発症群で若年発症群よりも軽度だった。線条体ダイノルフィンの発現は、高齢治療群で若年治療群よりも軽度だった。すなわち、高齢モデルの方がジスキネジアが軽症で、ジスキネジアの指標となる病理生化学的変化も軽度であったと言える。これらの研究成果をまとめ、論文発表した。

(7) 過去の研究報告や、今回の研究成果をとりまとめ、レボドパ誘発ジスキネジアの病態機序についての総説を執筆し、学術誌に受理されている。

<引用文献>

Sato et al. Prognosis of Parkinson's disease: time to stage III, IV, V, and to motor fluctuations. *Mov Disord* 2006; 21: 384-395.

Nishijima et al. Drebrin immunoreactivity in the striatum of a rat model of levodopa-induced dyskinesia. *Neuropathology* 2013; 33: 391-396.

Nishijima et al. Morphologic changes of dendritic spines of striatal neurons in the levodopa-induced dyskinesia model. *Mov Disord* 2014; 29: 336-343.

Cenci and Lundblad. Ratings of L-DOPA-induced dyskinesia in the unilateral 6-OHDA lesion model of Parkinson's disease in rats and mice. *Curr Protoc Neurosci* 2007; Chapter 9: 9 25 1-9 25 23.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nishijima Haruo, Kimura Tamaki, Mori Fumiaki, Wakabayashi Koichi, Kinoshita Iku, Nakamura Takashi, Kon Tomoya, Suzuki Chieko, Tomiyama Masahiko	4. 巻 13
2. 論文標題 Effects of Aging on Levo-Dihydroxyphenylalanine- Induced Dyskinesia in a Rat Model of Parkinson ' s Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Aging Neuroscience	6. 最初と最後の頁 650350
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnagi.2021.650350	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nishijima Haruo, Mori Fumiaki, Kimura Tamaki, Miki Yasuo, Kinoshita Iku, Nakamura Takashi, Kon Tomoya, Suzuki Chieko, Wakabayashi Koichi, Tomiyama Masahiko	4. 巻 178
2. 論文標題 Cabergoline, a long-acting dopamine agonist, attenuates L-dopa-induced dyskinesia without L-dopa sparing in a rat model of Parkinson ' s disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 93 ~ 97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2022.02.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishijima Haruo, Nakamura Takashi, Tomiyama Masahiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Morphological and functional changes of striatal neurons with L dopa induced dyskinesia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurology and Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ncn3.12562	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Murakami Yoshiki, Nishijima Haruo, Nakamura Takashi, Furukawa Tomonori, Kinoshita Iku, Kon Tomoya, Suzuki Chieko, Tomiyama Masahiko	4. 巻 806
2. 論文標題 Altered amantadine effects after repetitive treatment for l-dopa-induced involuntary movements in a rat model of Parkinson ' s disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 137248 ~ 137248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2023.137248	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 村上佳生, 西嶋春生, 中村崇志, 木下郁, 今智矢, 鈴木千恵子, 富山誠彦
2. 発表標題 パーキンソン病モデルラットにおけるアマンタジンの治療効果は反復投与により変動する
3. 学会等名 第159回弘前医学会例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西嶋春生
2. 発表標題 レボドパ誘発ジスキネジアに対するグルタミン酸受容体拮抗薬の効果の検討
3. 学会等名 令和2年度弘前大学機関研究・弘前大学異分野連携型若手研究支援事業・弘前大学グロウカル（Grow×Local）ファンド採択者による合同研究成果発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西嶋春生
2. 発表標題 Morphological and Functional Changes of Striatal Neurons in Dyskinesia
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西嶋春生, 村上佳生, 中村崇志, 木下郁, 引地浩基, 今智矢, 鈴木千恵子, 富山誠彦
2. 発表標題 パーキンソン病モデルラットにおけるアマンタジンの治療効果は反復投与により変動する
3. 学会等名 第16回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村崇志, 西嶋春生, 森文秋, 木下郁, 今智矢, 鈴木千恵子, 富山誠彦
2. 発表標題 L-dopa誘発ジスキネジアモデルラットにおける淡蒼球内節の病理学的変化の検討
3. 学会等名 第15回パーキンソン病・運動障害疾患カンファレンス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村崇志, 西嶋春生, 森文秋, 木下郁, 今智矢, 鈴木千恵子, 富山誠彦
2. 発表標題 L-dopa誘発ジスキネジアモデルラットにおける淡蒼球内節の病理学的変化の検討
3. 学会等名 カテコールアミンと神経疾患研究会2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takashi Nakamura, Haruo Nishijima, Fumiaki Mori, Iku Kinoshita, Tomoya Kon, Chieko Suzuki, Koichi Wakabayashi, Masahiko Tomiyama
2. 発表標題 Axon terminal hypertrophy of striatal projection neurons with levodopa-induced dyskinesia priming
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takashi Nakamura, Haruo Nishijima, Fumiaki Mori, Iku Kinoshita, Tomoya Kon, Chieko Suzuki, Koichi Wakabayashi, Masahiko Tomiyama
2. 発表標題 Axon terminal hypertrophy of striatal projection neurons with levodopa-induced dyskinesia priming
3. 学会等名 International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------